

主 論 文

Interaction of ovarian steroidogenesis and clock gene expression modulated by bone morphogenetic protein-7 in human granulosa cells.

(ヒト顆粒膜細胞の卵胞ステロイド合成における時計遺伝子とBMPの関与)

【緒言】

哺乳類において、時計遺伝子は視床下部・下垂体・生殖器軸を成す各組織に発現しており、体内時計の中枢である視床下部が、生殖軸の制御に関与していることは徐々に認識されつつある。末梢生殖臓器に存在する卵胞や卵巣顆粒膜細胞に時計遺伝子が存在することは明らかとなっているが、その詳細な働きに関しては未解明である。

最近の研究では、時計遺伝子が卵巣に存在し、卵胞発育に大きく関係していることが明らかとなった。時計遺伝子は卵胞のうち、原始卵胞や前胞状卵胞の時期には存在せず、初期胞状卵胞の時期から発現、排卵前の後期胞状卵胞にはより明確となる。その時期の顆粒膜細胞、莢膜細胞、卵母細胞、間質細胞に存在し、排卵準備に寄与していると考えられる。時計遺伝子が卵巣において、あるいは卵巣と卵巣外で機能しない場合には、様々な生殖異常が生じるだろう。しかしながらその制御機構や時計遺伝子の役割については未だ不明のままである。

生殖に関与する因子としては、成長因子やサイトカイン、ホルモンなどがあり、卵巣で局所的に作用している。哺乳類においては様々な成長因子が卵巣に発現し、オートクライン/パラクライン機構を形成、女性の受胎に重要な役割を果たしていることは明らかとなっている。Bone morphogenetic proteins (BMP) や growth differentiation factors (GDF) や actin, inhibin のような局所因子は、ゴナドトロピンと協調して卵胞の発育に重要な役割を果たしている。BMP リガンドと受容体は卵胞の発育過程で発現し、細胞特異的な BMP システムを形成している。BMP システムは主に顆粒膜細胞における follicle-stimulating hormone (FSH) 受容体の作用を制御することで、卵胞形成を微調整している。

今回我々は、Bmal、Clock、Period (Per)、Cryptochrome (Cry) といった時計遺伝子が、卵巣に存在する BMP といかに協調して、卵胞発育や卵巣ステロイド合成に関与しているかを検討した。

【材料と方法】

試薬と培養

Forskolin(FSK)と 4-androsteron-3,17-dione は Sigma-Aldrich 社、ヒト BMP は R&D Systems 社から購入した。ヒト顆粒膜細胞腫由来 KGN 細胞を用い、培養は 10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 DMEM/F-12 培地で 37°C、5% CO₂ 存在下に行った。

RNA 抽出と定量的 RT-PCR 分析

12 ウェルプレートで無血清の DMEM/F-12 培地で培養した KGN 細胞 (1×10⁵ 個/mL) を FSK (1 μM) あるいは BMP (100ng/mL) で処理した。TRI Reagent® (コスモ・バイオ株式会社) を用いてトータル RNA を抽出し、抽出した RNA 濃度は NanoDrop™ 超微量分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて計測した。プライマーはこれまで我々が行ってきた実験と同様のものを StAR、P450scc、P450arom、3 β HSD、RPL19 については用いた。他のプライマーは新たに DNA のコンタミによる PCR 産物を避けるため異なるエクソンから選んだ。逆転写は ReverTraAce® (東洋紡) で行い、LightCycler®、LightCycler®96 (Roche Diagnostic 社) でリアルタイム PCR を行った。RPL19 で補正し、ΔCt 法を用いて標的遺伝子の発現量を検討した。

トランスフェクションとステロイドアッセイ

12 ウェルプレートで KGN 細胞 (1×10⁵ 個/mL) を 10%FCS 含有 DMEM/F12 培地で培養した。Clock の siRNA とコントロール siRNA は 10 μM (30pmol/well) に希釈、KGN 細胞に対するトランスフェクション時間を 12 時間として、トランスフェ

クシオンは Santa Cruz 社が推奨するプロトコルに従った。

ウエスタンブロット

12 ウェルプレートを使用し KGN 細胞を培養、RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology) で細胞蛋白を回収した。SDS-PAGE/ウエスタンブロットの施行にあたり、Clock、Bmal1、Per2、Cry1 に対する抗体は Santa Cruz Biotechnology、actin に対しては Sigma-Aldrich 社の抗体を使用した。ウエスタンブロットで検出したバンドは C-Digit® Blot Scanner System (LI-COR Biosciences) を用いて定量した。

統計解析

全ての結果は少なくとも異なる 3 検体から 3 回以上の実験データの平均値±標準偏差により示した。各群の有意差は、ANOVA 法および Fisher PLSD 法あるいは unpaired t-test によって解析し、P 値<0.05 を統計学的有意差ありとした。

[結果]

まず、ヒト顆粒膜細胞腫由来の KGN 細胞を FSK 刺激後 24 時間培養したときの各時計遺伝子 (Clock、Bmal1、Per2、Cry1) の発現量について、PCR 法を用いて mRNA を継時的に計測した。その結果、Clock と Bmal1 は一過性に上昇し、Per2 と Cry1 は FSK 刺激後 1-3 時間後に低下しており、それぞれが類似したパターンを示した。Western Blotting で、同様の処理をした KGN 細胞の 24 時間後の各産生蛋白量を計測したところ、mRNA の結果と同様に蛋白レベルでも CLOCK と BMAL1 の産生蛋白量は増加、PER2 と CRY1 の産生蛋白量は減少を示した。

次に、KGN 細胞における卵巣ステロイド合成酵素 (StAR、P450scc、3 β HSD、P450arom) と各時計遺伝子の発現量について mRNA を計測して相関を検討した。その結果、特に Clock と P450arom において正の相関、Clock と 3 β HSD において負の相関を有意に認めた。これらに注目してさらに Clock を siRNA でノックダウンした場合に、FSK でステロイド合成を刺激して P450arom と 3 β HSD の発現量を計測した。結果、P450arom の発現量は減少、3 β HSD の発現量は増加を認め、蛋白レベルにおいても同様の結果であった。またこのときの産生ホルモン量について計測したところ、エストロゲンは減少、プロゲステロンは増加を認めた。従って、Clock が P450arom の発現およびエストロゲンの合成を促進し、また 3 β HSD の発現およびプロゲステロンの合成を抑制していることが明らかになった。

また、卵巣の各細胞に発現する BMP と Clock との関係について、さらに研究を行った。100ng/mL で各卵巣 BMP リガンドを添加した培地で 24 時間培養を行った KGN 細胞での Clock の発現について mRNA を計測した。卵巣 BMP-2、-4、-6、-7、-9 のうち、最も Clock の発現量を増加させたのは BMP-7 であった。BMP-7 を添加し 24 時間培養を行った KGN 細胞について、CLOCK の蛋白産生量を計測したところ、これについても増加を認めた。

[考察]

卵巣において時計遺伝子がステロイド合成系や卵胞形成、細胞分化、ゴナドトロピン反応性、排卵などに関与していることが知られている。卵巣顆粒膜細胞のリズムには自律性があり、FSH 受容体や luteinizing hormone (LH) 受容体やステロイド合成酵素など、さまざまな遺伝子の発現が卵胞発育に関与していることは既に報告されている。例えば、Bmal1 をノックアウトしたマウスにおいて、プロゲステロン分泌や着床が減少、また卵巣の Bmal1 を選択的にノックアウトしたマウスにおいてもプロゲステロン分泌は減少、着床数も減少したと報告されている。すなわち、Bmal1 は黄体化した顆粒膜細胞からのプロゲステロン分泌と排卵後の高いプロゲステロン分泌の維持に寄与していることを示唆する。

一方、マウスの卵巣において shRNA で Clock をノックダウンした場合に、排卵数および出生数が減少したと報告されている。Clock や Per2 はヒトの卵巣の主席卵胞で

も発現しており、テストステロンが誘因となって **Per2** と **StAR** の発現量が変化する。このことは、多嚢胞性卵巣症候群における高アンドロゲン血症と卵巣ステロイド合成障害の間に時計遺伝子の発現パターンが関与していることを示唆している。また **Per2** と **Clock** が顆粒膜細胞に異なる作用を示し、細胞増殖、ステロイド合成、**LH** 受容体発現に関わり、排卵に至る卵胞の選択にも関与していると報告されている。

今回の研究では、ヒト顆粒膜細胞腫由来 **KGN** 細胞における、時計遺伝子と卵巣ステロイド合成系の機能連関について明らかにした。既に我々は **KGN** 細胞に発現する **FSH** 受容体が低反応であり、**FSK** 刺激が卵巣ステロイド合成の促進に有用であることを報告しており、今回の研究でも **FSH** ではなく **FSK** を用いた。注目すべきは、各時計遺伝子と卵巣ステロイド合成系との相関のうち、**Clock** が **P450arom** の発現量と強い正の相関を示し、**3 β HSD** とは強い負の相関を示したことである。**siRNA** を用いて **Clock** をノックダウンすると、**P450arom** の発現とエストロゲン産生が減少、一方、**3 β HSD** の発現とプロゲステロン産生は増加した。更に **BMP-7** が **Clock** の発現を増加させた。すなわち、ヒト顆粒膜細胞において **FSK** や **BMP-7** が **Clock** の発現量を増加させ、その結果、エストロゲン増加およびプロゲステロン減少に至ることが明らかとなった。

BMP は女性の生殖器においてオートクライン・パラクラインシステムを形成し、生殖に重要な役割を果たしている。卵巣顆粒膜細胞に発現する各 **BMP** リガンドは、**FSH** が誘導するステロイド合成系において異なった作用を持つ。莢膜細胞には **BMP-4**、**-7** が発現し、顆粒膜細胞のエストロゲン産生を促進、プロゲステロン産生を抑制する。また **BMP-7** は、原始卵胞から発育する卵胞の選択に関与する。**BMP-6** は **FSH** 刺激が誘導するステロイド合成反応のうち、アデニルシクラーゼの働きを抑制し、プロゲステロン産生を妨げる。**BMP-7** は **FSH** が誘導する **ERK1/2** 経路を抑制し、エストロゲン産生を促進する。**BMP-2**、**-4** は **FSH** が誘導する **p38-MAPK** を刺激し、その結果、エストロゲン産生を増加させる。卵巣に発現している **BMP** リガンドだけでなく、体内を循環している **BMP-9** も同様に顆粒膜細胞においてプロゲステロン合成を抑制する作用を持っている。

我々は、**BMP-7** が **Clock** の mRNA および蛋白の発現を増加させることを明らかにした。ヒト顆粒膜細胞において **Clock** の発現がエストロゲン合成を増やし、プロゲステロン合成を減らすことから、**BMP-7** の卵巣におけるステロイド合成系に対する作用には、**Clock** の発現を介していると考えられる。以前我々は、**BMP-7** がラットの顆粒膜細胞において、**StAR** の発現およびプロゲステロン産生を抑制し、**P450arom** の発現およびエストロゲン産生を促進したことを報告した。今回の研究においては、**BMP-7** は **StAR** ではなく **3 β HSD** の発現に相関を認めたが、これはラットとヒトという種の違いによるものだろう。ヒトにおいて卵巣ステロイド合成系に関与する他の物質としては、アンドロゲン、インクレチン、オレキシン、メラトニンなどがあり、それぞれ顆粒膜細胞における内因性 **BMP-Smad** シグナルへの影響が指摘されている。おそらくこれらの物質は **Clock** の発現へも影響すると考えられる。時計遺伝子と卵巣ステロイド合成系との間に存在する機能連関の解明が今後の研究課題である。

【結論】

今回我々の研究では、時計遺伝子と **FSK** が誘導する卵巣ステロイド合成系との間に関係があることが新たに明らかになった。すなわち、**Clock** が **P450arom** と正の相関を持ち、一方で **3 β HSD** と負の相関を示した。また **Clock** が顆粒膜細胞のステロイド産生を決定する要であり、そこに **BMP-7** といった成長因子が関与していることが示唆された。